

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-505535

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)6月22日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 Q 1/68
C 07 H 21/04
C 12 N 15/09

識別記号 庁内整理番号
Z N A A 9453-4B
B 8615-4C

F I

9281-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全10頁)

(21)出願番号 特願平6-516767
(86) (22)出願日 平成6年(1994)1月31日
(85)翻訳文提出日 平成6年(1994)9月29日
(86)国際出願番号 PCT/FR94/00122
(87)国際公開番号 WO94/17205
(87)国際公開日 平成6年(1994)8月4日
(31)優先権主張番号 93/00978
(32)優先日 1993年1月29日
(33)優先権主張国 フランス(FR)
(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71)出願人 アンスティチュ バストゥール
フランス国 75724 パリ セデックス
15 リュ ドュ ドクトゥールルー 28
(72)発明者 ゲスドン, ジャンールュク
フランス国 92310 セブレ グランーリ
ュ 33
(72)発明者 ストネ, ヴェロニク
フランス国 92600 アスニエール リュ
ドゥ ラ サブリエール 24
(74)代理人 弁理士 越場 隆

(54)【発明の名称】 カンピロバクタージュジュニ (Campylobacter jejuni) のゲノムの核酸の塩基配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列

(57)【要約】

ヌクレオチド配列No. 1、ヌクレオチド配列No. 2、これらの相補的な配列およびこれらの配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列の中から選択されるCampylobacter jejuniのゲノムの核酸配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列。これはその他のCampylobacter種の核酸とはほとんどハイブリダイズしない。この配列の断片はCampylobacter jejuniに特異的な配列の增幅用の特異的プライマーまたはCampylobacter jejuniの核酸配列に特異的な核酸プローブとして使用できる。本発明は生物試料中のCampylobacter jejuni株の存在を検出する方法とそれに用いるキットを対象とする。

特表平-505535 (2)

請求の範囲

1. *Campylobacter jejuni*のゲノムの塩基配列と特異的にハイブリダイズするスクレオチド配列において、

スクレオチド配列No.1と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列の中から選択されることを特徴とする塩基配列。

2. 請求項1に記載のスクレオチド配列の全部または一部を含むスクレオチド配列。

3. スクレオチド配列No.2と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列の中から選択される請求項1に記載のスクレオチド配列を有するスクレオチド配列。

4. 請求項1～3のいずれか一項に記載の配列の1つの増幅生成物。

5. 請求項1～3のいずれか一項に記載のスクレオチド配列を含むことを特徴とするクローニングベクター。

6. 請求項1～4のいずれか一項に記載のスクレオチドより選択された少なくとも20の連続するスクレオチドを有することを特徴とする *Campylobacter jejuni* の核酸に対して特異的な核酸プローブ。

- b) *Campylobacter jejuni*に属する核酸を増幅させ、
- c) プライマーを両側に有する断片に対応する *Campylobacter jejuni* の核酸の断片が増幅されたことを検出し、
- d) 特異的プローブのハイブリダイゼーション、シーケンシングまたは制限部位分析等によって増幅された断片を必要に応じて確認する。

12. 下記段階を特徴とする食物試料中の *Campylobacter jejuni* の存在を検出する方法：

- a) 低速遠心分離で粗食物組織を除去し、
- b) 食物試料と請求項9または10に記載のプライマーベアとをプライマーが *Campylobacter jejuni* の核酸にハイブリダイズするような条件下で接触させ、この場合、必要に応じて、食物サンプル中に含まれる *Campylobacter jejuni* の核酸を用ひハイブリダイゼーションし易い状態としておき、
- c) *Campylobacter jejuni*に属する核酸を増幅させ、
- d) プライマーを両側に有する断片に対応する *Campylobacter jejuni* の核酸の断片が増幅されたことを検出する。

13. 下記要素を有することを特徴とする生物試料中または食物試料中の *Campylobacter jejuni* の存在を検出するためのキット：

- 1) 請求項9または10に記載のプライマーベア、
- 2) *Campylobacter jejuni*の核酸を増幅させる試薬、
- 3) 必要に応じて増幅した断片の配列を確認するもの、特に、請求項6～8に記載の核酸プローブ。

14. *Campylobacter jejuni*株を特定の *Campylobacter jejuni*株として特定・分類するための疫学的手段としての請求項6～8

7. スクレオチド配列No.1と、スクレオチド配列No.2と、これらの相補的な配列と、これらの配列の少なくとも1つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列の中から選択される請求項6に記載の *Campylobacter jejuni* の核酸に対して特異的な核酸プローブ。

8. 携体上に固定されてキャプチャープローブとして使用される請求項8または7に記載の核酸プローブ。

9. 請求項1～4のいずれか一項に記載の配列より選択されるスクレオチドを18～30個、好ましくは18～22個有するオリオスクレオチドペアで構成されることを特徴とする *Campylobacter jejuni* の核酸配列の増幅に特異的なオリゴスクレオチドプライマーベア。

10. 下記配列を有するオリゴスクレオチドペアで構成されることを特徴とする請求項9に記載の *Campylobacter jejuni* の核酸配列の増幅に特異的なオリゴスクレオチドプライマーベア：

5'-GAA TGA AAT TTT AGA ATG GGG 3'
5'-GAT ATG TAT GAT TTT ATC CTGC 3'

11. 下記段階を特徴とする生物試料中の *Campylobacter jejuni* の存在を検出する方法：

- a) 生物試料と請求項9または10に記載のプライマーベアとをプライマーが *Campylobacter jejuni* の核酸にハイブリダイズするような条件下で接触させ、この場合、必要に応じて、生物サンプル中に含まれる *Campylobacter jejuni* の核酸を用ひハイブリダイゼーションし易い状態としておき、

のいずれか一項に記載の核酸プローブの使用。

特表平7-505535 (3)

明細書

カンピロバクタージュジュニ (*Campylobacter jejuni*) のゲノムの塩基配列と特異的にハイブリダイズするスクレオチド配列

本発明はカンピロバクタージュジュニ (以下 *Campylobacter jejuni* または *C. jejuni* と表記する) に特異的な核酸の塩基配列と、この塩基配列を用いて生物サンプル中の *Campylobacter jejuni* の DNA または RNA を増幅させるためのスクレオチドプライマーとしての *Campylobacter jejuni* の配列またはその断片を検出するための特異的スクレオチドプローブとしての応用とに関するものである。

カンピロバクター感染症は世界中で人および野生動物または家畜の両方に広く拡がっている感染症である。

現在カンピロバクター (*Campylobacter*) と呼ばれるこのバクテリアは20世紀初頭には発見されていたが、同定および培養が困難であったため長い間無視されてきた。最初に羊および牛から単離された当時は *Vibrio fetus* と呼ばれ、*Campylobacter fetus* と呼ばれるようになったのは後である。人間で最初のカンピロバクター症例が報告されたのは1946年のことであるが、カンピロバクター感染症の重大さが実証され、認識されるようになったのはカンピロバクター用の選択的培地が開発され始めた1972年からである。

Campylobacter fetus 型の種が命名されて以来、その他の種および亜種が12種類の発見された。その正確な数字は命名者および分類法によって変わる。多くの場合、全く新規な分類基準が提案される。

これらの中で人間および／または動物の病理で最も多く見られるのは *Campylobacter jejuni* と、*Campylobacter coli* と、*Campylobacter fetus* である。現在では、人間における伝染性下痢の最大の原因是 *Campylobacter jejuni* であると考えられている。

1986年にフランスで設立された「カンピロバクター感染症監視ネットワーク (réseau de surveillance nationale des infections à *Campylobacter*)」は、報告例についての疫学的データおよび臨床データのレジメを毎年発行している。例えば、1988年、1989年および1990年ではこの感染症に関するとされた種で最も多かったのは *C. jejuni* であった (分析したケースの60~75%)。

人間の腸での *C. jejuni* 感染症の主要な症状は下痢であり、最も深刻なケースでは重度の脱水症状となり、脱水症に対して弱い子供と幼児には特に危険である。しかし、多くの場合、*C. jejuni* による腸炎は合併症を起こさないまま一週間後に自然に止まる。しかし、糞便培養結果は数週間後あるいは一ヶ月後でも陽性のままであり、5~10%のケースは再発する。すなわちカンピロバクターは人の体内で日和見バクテリア的に挙動するので、免疫が抑制されている人および深刻な疾病持つ人 (エイズ、肝硬変、癌、白血病等の患者) の場合には徹底した処置と監視が必要がある。

上記以外に *C. jejuni* 感染結果として報告されているものは腸間膜炎、胆囊炎、泌尿器感染、髄膜炎、敗血症、結節性紅斑またはギラン-バレ症候群などであるが、これらは例外的かつ稀なケースである。

動物ではカンピロバクターは通常共生生物として牛、羊、豚、家禽、野生の鳥、犬および猫等の多くの種の消化管内に住んで

いる。これらの動物は病気に罹っているか健康キャリヤーであるかに係わらず巨大な保菌宿主を構成しているので、感染の危険は高い。牛および羊での明らかな感染ケースで *C. jejuni* が「家畜赤痢 (dysenterie du bétail)」の原因であることは1931年の最初の報告から知られている。その結果、家畜への影響だけではなく、微生物が動物の周囲 (地面や水) に蔓延して人間にに入る危険がある。無症候動物すなわち「健康キャリヤー」の場合でも、これら動物やその排泄物に直接接触したり、汚染された食物や水 (調製時に汚染された肉や十分に調理されていない肉や低温殺菌されていない牛乳、汚染された水等) を飲食すると、人間に入ることになる。

従って、病原である *C. jejuni* を一日でも早く同定することは、適切な方法で人と動物の両方でのコンタミネーションを防ぐために予防的侧面から極めて重要である。特に、無菌状態の必要とする食品業界の場合に重要である。また、*C. jejuni* に感染後した患者の治療後の正しいモニタリングや再発の完全予防の点で人間の病理学でも重要である。

さらに、感染時に感染の進行と伝染・伝播を防ぐための適切かつ効果的な処置が行えるようにするために、原因となる微生物を発病後に迅速かつ正確に同定することが極めて重要である。

しかし、カンピロバクターの同定とその関連種の決定は容易ではない。すなわち、従来法では、単離に特別な培地を必要とし、少なくとも48時間培養して濃縮してからでないとこの微生物は検出できない。この時間は迅速な診断を必要とする場合には長過ぎる時間である。また、現在の微生物学的診断は異種間に存在する表現型の違いを利用する細菌学的および／または生物学的手法であり、所定の特性に対して突然変異体が現れた場

合には診断ミスとなる危険性がある。*C. jejuni* と *C. coli* を区別する唯一の基準は馬尿酸塩を加水分解するか否かである (*C. jejuni* は加水分解できるが、*C. coli* はできない)、区別不可能ということも起り得る。事実、馬尿酸塩に対して陰性の *C. jejuni* 株も存在する (Hebert 連、J. Clin. Microbiol., 1984, 20, 138-140, Totten 連、J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 1747-1752)。

C. jejuni 種の同定に分子ハイブリダイゼーションを用いる方法は既に提案されている。しかし、公知の方法は培養後にしか同定が行えず、生物試料中でこのバクテリアを検出するには感度が不十分である。そのため、放射性プローブ (Ng 連、Mol. Cell. Probes, 1987, 1, 223-243) を用いたり、非放射性プローブ (Chevrier 連、J. Clin. Microbiol., 1989, 27, 321-326) を用いたカンピロバクターの同定・分離方法が提案されたが、これらの方法では全ゲノムプローブを使用する必要があり、しかも、検出閾値が約 10^5 バクテリアと非常に高いために培養による濃縮が必要である (Chevrier 連、上記)。

種を判定するためにピッケン連 (Picken et. al. Mol. Cell. Probes, 1987, 1, 245-259)、コロリック連 (Korolik et. al. J. Gen. Microbiol., 1988, 134, 521-529) およびズーとワング (Zhou and Wang (Zbl. Bakt., 1989, 272, 186-190) は *C. jejuni* の特異的核酸プローブを研究したが、特異性の問題は残っており、プローブとなる可能性のある配列は決定されていない。同様に、アルカリホスファターゼに結合したオリゴマーで構成された別の *C. jejuni* の「特異的」プローブも報告されている (Jablonski et. al., N.A.R., 1986, 14, No. 15) (配列は公開されていない)。しかし、この特異性は *C. jejuni* 由来の断片についてテストされているのみで、*C. jejuni* とカンピ

特表平7-505535(4)

ロバクター属のその他の種のゲノム全体に対してはテストされていない。

最近、*C. Coli* VCI67 の fla A 遺伝子から選択したオリゴヌクレオチドを用いて PCR によって *C. jejuni* を同定する方法が報告された (Oyofo et al., J. Clin. Microbiol., 1992, 30, No. 10, 2613-2619)。しかし、この方法では *C. Coli* と *C. jejuni* を区別することができない。

本出願人らは、*Campylobacter jejuni* 種に特異的な検出法に使用可能な核酸の塩基配列を単離した。

従って、本発明の対象は、*Campylobacter jejuni* のゲノムの核酸塩基配列と特異的にハイブリダイズするヌクレオチド配列において、ヌクレオチド配列 No. 1 と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも 1 つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列の中から選択されることを特徴とする塩基配列にある。

本発明の他の対象は、上記のヌクレオチド配列の全部または一部を含むヌクレオチド配列、特にヌクレオチド配列 No. 2 と、これと相補的な配列と、この配列の少なくとも 1 つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列の中から選択されるヌクレオチド配列を有するヌクレオチド配列にある。

「少なくとも 1 つの塩基の突然変異、挿入、欠失または置換に起因して変化した配列」とは、サムブルック、フリーシュ、およびマニアチスが定義した通常のストリングエンサーの条件 (SAMBROOK J., FRITSCH E. R. and MANIATIS T : Molecular Cloning (1989). A Laboratory Manual, Ed. Cold. Spring Harbor Laboratory 9.47-9.62) 下で、配列 No. 1、配列 No. 2 またはこれらと相補的な配列とハイブリダイズする配列を意味す

る。この条件は培地のストリングエンサー温度 T_m で決まる。

最も有利な配列は ($T_m - 15^\circ\text{C}$) から ($T_m - 20^\circ\text{C}$) の温度範囲でハイブリダイズする配列である。

本発明の配列は少なくとも 12 個のヌクレオチドを有するのが有利である。

本発明のさらに他の対象は、上記で定義の配列の増幅生成物 (produits d' amplification) にある。

本発明のさらに他の対象は、上記定義のヌクレオチド配列を含むクローニングベクターにある。

上記定義のヌクレオチド配列は DNA 配列でも RNA 配列でもよい。

配列 No. 1 の断片の正確なサイズは 147 bp である。この配列は *C. jejuni* 種に対して特異的で、カンピロバクター属のその他 8 つの代表的な種とはハイブリダイズしない。

配列 No. 2 の断片の長さは 1,189 bp で、*C. coli* と極めて軽くハイブリダイズするが、試験を行ったその他 7 つのカンピロバクター種とはハイブリダイズしない。

データベース「Genebank」および「EMBL」を検索したが、配列 No. 1 および配列 No. 2 と公知 DNA 配列との間には類似性は全くなかった。

配列 No. 1 および配列 No. 2 は、機能的に均等な部分または変体で、*Campylobacter jejuni* を検出および同定するための分子ハイブリダイゼーション法で用いることができる。

機能的に均等な変体には、これらの断片の特異性に必須な特性を損なわずに塩基対が突然変異、欠失、挿入または置換された配列が含まれる。

本発明のヌクレオイド配列は医学および獣医学における診断および疫学的用途で、特に *Campylobacter jejuni* の特異的な

核酸プローブまたは *Campylobacter jejuni* の特異的配列の増幅 (amplification) 用のオリゴヌクレオチドプライマーとして用いることができる。

本発明プローブは上記配列または配列の断片中に少なくとも 20 の連続したヌクレオチドを含んでいるのが有利である。このプローブは DNA プローブか RNA プローブである。

本発明のヌクレオチド配列は、生物試料中の *Campylobacter jejuni* を特異かつ直接的な方法で特異的に検出するためのプローブとして使用することができる。このプローブはバクテリアが属する生物型とは無関係に *Campylobacter jejuni* 種のバクテリアを検出することができる (*C. jejuni* 種のバクテリアは馬尿酸塩を加水分解して H_2S と D_{Nase} を産生する能力に応じて I, II, III および IV 型とよばれる 4 つに分類されるの "Lior biotype" が存在する)。

本発明オリゴヌクレオチドプローブは亜種である *C. jejuni* subsp. *doylei* も検出することができる。

本発明のオリゴヌクレオチドプローブは *C. jejuni* と同じ生物試料中に存在する可能性のあるその他の種類: *Bacteroides fragilis*、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium* および *Streptococcus agalactiae* に属するバクテリアからの DNA を検出することはない。

ラベルしていない配列をプローブとして直接使用することができるが、通常は、多くの用途で使用できるプローブとするために、配列を放射性元素 (^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{3}H 、 ^{125}I) または非放射性分子 (ビオチン、アセチルアミノフルオレン、ジゴキシゲニン、5-プロモデオキシウリジン) でラベル化する。

後者の場合には、フランス国特許第 2,422,956 号および第 2,518,755 号に記載のラベル方法のいずれかを用いることができる。

ハイブリダイゼーションは種々の方法で行うことができる (Matthews, J. A. and Kricka, L. J., Anal. Biochem., 1988, 169, 1-25)。最も広く採用されている方法は *Campylobacter jejuni* の細胞から抽出した核酸を担体 (ニトロセルロース、ナイロン、ポリスチレンなど) に固定し、固定した核酸とプローブとを所定の条件下培養する方法である。ハイブリド化させた後、過剰なプローブを除去し、形成されたハイブリッド分子を適当な方法で検出する (プローブの放射能、蛍光活性または酵素活性を測定する等)。

本発明の核酸プローブはキャプチャープローブ (sandwich de capture) として使用することもできる。この場合にはプローブを担体に固定し、*C. jejuni* から抽出した標的の核酸を特異的ハイブリダイゼーションによって捕獲する。必要な場合には、固体担体を試料から分離し、キャプチャープローブと標的核酸との間に形成されたデューブレックス (duplex) を、検出が容易な元素でラベルした第 2 の検出プローブを用いて検出する。

分析試料から十分な量の *Campylobacter jejuni* の核酸が抽出できる場合には上記配列を用いて分析試料から *Campylobacter jejuni* に属する株を直接同定することができる。そうでない場合には、*Campylobacter jejuni* から核酸を抽出する前に液体培地中で迅速に培養するか、試料から抽出できる少量の *Campylobacter jejuni* の核酸を増幅 (amplification)、例えば PCR 法で増幅する。

オリゴヌクレオチドプライマー (amplification oligonucleotides) 特に PCR 法用のプライマーは、配列 No. 1、配列 No. 2 またはこれらの配列の断片から選択することができる。

この増幅法では増幅すべき断片の両側に付ける (encardant) オリゴヌクレオチドペアを選択する必要がある (米国特許第 4,

特表平7-505535(5)

683,202号)。このオリゴデオキシリボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドのプライマーの長さは18~30、好みくは18~22ヌクレオチドであるのが有利である。2つのプライマーの中の1方は鏡型の(+)鎖と相補的で、他方のプライマーは(-)鎖と相補的である。これらのプライマーが二重構造または互いに相補的な配列を含まないことが重要である。また、各プライマーの配列の長さはプライマーが原核細胞または真核細胞、特に*jejuni*種に属さないカンピロバクター由来の核酸および試料中に入り込む可能性のある人間のDNAまたはRNAとハイブリダイズしないような長さを選択しなければならない。

*Campylobacter jejuni*株の塩基配列の增幅用の特異的プライマーとして選択されるアンプリマーは例えばグリフェイス述の方法に従って選択される (Griffais et al., Nucleic Acids Res. 1991, 19, 3887-3891)。

本発明者はPCR法用に配列No.2からのオリゴヌクレオチドを選択した。このオリゴヌクレオチドを用いることによって*Campylobacter jejuni*が特異的に増幅され、その他のカンピロバクター種由来の核酸の増幅は見られなかった。

特に最も好ましいプライマーペアは配列No.2由来の下記配列のオリゴヌクレオチド VS15 および VS16 である:

VS15: 5' GAA TGA AAT TTT AGA ATG GGG 3'
VS16: 3' GAT ATG TAT GAT TTT ATC CTGC 5'

増幅された断片はアガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動またはキャビラリー電気泳動を行って同定するか、クロマトグラフィー法(ゲル通過、疎水性クロマトグラフィーまたはイオン交換体クロマトグラフィー)を行って同定することができる。増幅特異性はプローブとしてヌクレオチド配列No.1または配列No.2、その断片、これらの配列またはその断片を含

むプラスミド、これらの配列またはその配列の断片と相補的なオリゴヌクレオチドまたは増幅生成物を用いた分子ハイブリダイゼーションによって管理することができる。これらのプローブは放射性元素または非放射性分子でラベルされていても、それでいてなくてもよい。

本発明のさらに他の対象は、下記段階を特徴とする生物試料中の*Campylobacter jejuni*の存在を検出する方法にある:

- i) 生物試料とプライマーと呼ばれるオリゴヌクレオチド断片のペアとを、プライマーが *Campylobacter jejuni* の核酸にハイブリダイズするような条件下で接触させ、この場合、必要に応じて、生物サンプル中に含まれる *Campylobacter jejuni* の核酸を予めハイブリダイゼーションし易い状態としておき、
- ii) *Campylobacter jejuni*に属する核酸を増幅させ、
- iii) プライマーを両側に有する断片に対応する *Campylobacter jejuni* の核酸の断片が増幅されたことを検出し、
- iv) 特異的プローブのハイブリダイゼーション、シーケンシングまたは制限部位分析等によって増幅された断片を必要に応じて確認する。

アガロースゲルを用いた場合のPCR増幅後の検出限界は、*C. jejuni* のバクテリア懸濁液を10倍に順次希釈して増幅した時に1バクテリアである。

本発明のさらに他の対象は、下記要素を有することを特徴とする生物試料中の*Campylobacter jejuni*の存在を検出するためのキットにある:

- 1) 上記で定義のオリゴヌクレオチド断片のペア、
- 2) *Campylobacter jejuni*株に由来する核酸を増幅させる試薬、
- 3) 必要に応じて増幅した断片の配列を確認するもの、特に、

上記定義の核酸プローブ。

このキットはラベル化されたまたはラベル化されていないプローブを含んでいるのがさらに好みである。これらは溶液状態でも、固体に固定されていてもよい。キットにさらにバクテリアの培養および標的核酸の抽出に必要な試薬と、選択した方法に対応したハイブリッド化溶液および洗浄液を含めることもできる。

本発明のさらに他の対象は、上記定義の核酸プローブの医学的道具としての分子疫学での利用にある。

実際、*C. jejuni* のゲノム中に特定の断片が数回存在する場合、この反復性は同一の株の同定・分類の道具となり、その根柢と感染の伝播との関連を調べることができる。

以下、本発明の実施例を説明する。

添付図面は配列No.2(断片VS1)の配列決定手法を示している。

実施例1

*C. jejuni*ゲノムライブリーラーの作成と、ライブリーラーのスクリーニングと、特定断片の配列決定

パストール研究所 (Pasteur Institute Collection) 提供の*C. jejuni* CIP 70.2由来のゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼ *Hind* IIIを用いて部分的に切断する。メーカーの推奨するバッファー中で37℃で1時間、DNA 1 μg当たり0.06Uの酵素を反応させる。こうして切断されたゲノムDNAを0.5%アガロースゲル上で電気泳動で分離し、長さ30~40kbの断片を電気的に溶出させ、フェノール/クロロホルム(1/1)で抽出した後、エタノール中で沈殿させる。

ベクターはベーリンガー社 (Boehringer) から提供されたコ

スミド ref. pHC79 である。これを同様の方法で切断し、セルフリゲーションを完全に避けるために脱リン酸化する。

リゲーションは、700ngのベクターと30/40kbのDNA断片1.5 μgとを混合し、この混合物に適当なバッファーを入れたT4 DNAリガーゼ1ユニットを添加した後、14℃で18時間放置して行った。

組み換えコスミドをインビトロでカプセル化し、バクテリア(*E. coli* HB 101)の形質転換に使用する。形質転換されたバクテリアはLB培地で37℃で1時間培養した後、25 μg/nlのアンビシリンを含む選択的アガーベース培地上に置く。アンビシリン耐性のコロニー全に対してテトラサイクリンに対する感受性テストする(30/40kbのDNA断片はテトラサイクリン(Tet)耐性遺伝子を不活性化してアンビシリン(Amp)耐性遺伝子を保存するようベクターに挿入される)。

アルカリ溶菌法でアンビシリン耐性(Amp^r)且つテトラサイクリン感受性(Tet^s)の最初の形質転換コロニー60個から小規模にDNA調製する。この調製物からのDNAを制限エンドヌクレアーゼ *Hind* IIIで切断し、0.8%アガロースゲル上で電気泳動分析し、次いでナイロンフィルター上に移す。DNAを254nmの紫外線に3分間曝して不可逆的に固定する。

各フィルターを、10%のデキストラン硫酸、濃縮されたデンハルド5X溶液(Denhardt's solution)(1Xのデンハルド溶液は0.02%のFicoll、0.02%のポリビニルピロリドンおよび0.02%の牛血清アルブミンに相当する)、10 mMのEDTA、0.5%のSDS、100 μg/nlの変性されたサケ精子DNAおよび下記3つの種:

C. jejuni CIP 70.2、
C. coli CIP 70.80 および

C. fetus subsp. *fetus* CIP 5396

のいずれかを「マルチプライミング (多重増幅、amorcage multiple)」で³²Pで放射活性したゲノムDNAを含む6XのSSC Cバッファー (1XのSSCは0.15Mの塩化ナトリウムおよび0.015Mのクエン酸ナトリウムとに相当する) 中で、65°Cで16~18時間培養する。

ハイブリダイゼーション後、フィルターを例えば65°Cの2XSSCで10分間2つ2回、65°Cの2XSSC+0.1%のSDSで30分間1回、最後に65°Cに0.1XのSSCで10分間1回洗浄する。湿ったままのフィルタを増感板を用いて-80°Cで15分から3日間オートラジオグラフィーにかける。

このハイブリダイゼーションの結果、VS1と名付けられる約1.2kbの断片を含むコスミドのクローニングが単離される。この断片をベクターpUC18 (ベーリングー社から市販) でクローニングして大量調製する。得られたプラスミドをpVS20と名付けた。

この断片の特異性は実施例2に記載の方法で確認した。

上記VS1断片をW13mp18ファージでクローニングし、シーケンシングキット「シーケナーゼ」(登録商標 Sequenase 2.0、米国、バイオケミア社 (Biochemical Corporation) 製) を用いてサンガー (Sanger) 法で配列決定した。断片 VS1の幾つかの部分は、2本のDNA鎖をアルカリ変性した後プラスミドpVS20で直接配列決定された。シーケンシング反応は全て³⁵Sでラベル化したdATPを用いて行った。

添付の線図は断片 VS1のシーケンシングに用いた手法を示すもので、2、3、4、5、6、7、14、16、17、18はシーケンシングで用いた各種プライマーを示している。FPおよびRPはpUC18およびW13mp18のDNAに共通な相補的プライマーで

ある。

断片の全体配列が配列No.2である。

こうして決定された断片 VS1の1189個のヌクレオチドをデータベース「Genebank」および「EMBL」と比較したが、現在公知の配列に類似のものは見出せなかった。

実施例2

本発明の核酸配列をプローブとして使用した

サンサン法によるDNA分析

本試験で用いたバクテリアの符号リストは以下の通り：

カンピロバクター：

- C. jejuni CIP 70.2
- C. coli CIP 70.80
- C. lari CIP 102722
- C. fetus subsp. *fetus* CIP 5396
- C. fetus subsp. *venerealis* CIP 5829
- C. *hyoilectinalis* C 120
- C. *curvus* (Hopital des Enfants, Bordeaux)
- C. *sputorum* subsp. *sputorum* CCUG 9728
- C. *sputorum* subsp. *bubulus* CIP 53103
- C. *concisus* 16638
- C. *facalis* CIP 12014

カンピロバクター以外：

- Escherichia coli* HB101
- Helicobacter pylori* CIP 101260
- Salmonella typhimurium* CJ 53
- A. cryaerophilus* CCUG 1780

実施例で使用したプローブは断片 VS2 (配列No.1) と、断片 VS1を酵素Bgl IIで加水分解して得られる断片 VS3とで、これら2つのプローブは³²Pでラベル化されている。

プローブ VS2 は C. jejuni 由来のDNAを特異的に検出し、その他のカンピロバクター種のゲノムDNAとはハイブリダイズしない。

プローブ VS3 は C. jejuni 由来のDNAを検出すると同時に C. coli ゲノム上のDNA断片とも極めて軽くハイブリダイズする。このクロスハイブリダイゼーションは16時間暴露させた後にのみ検出可能である。一方、C. jejuni 由来のDNAはわずか15分の暴露後に検出された。

これらの結果から、プローブ VS1 (配列No.2) はそれ以外の属のバクテリア由来のDNAの中で C. jejuni 由来のDNAを特異的に検出し、断片 VS2 (配列No.1) はカンピロバクター属内で正確に同定した場合に C. jejuni を特異的に認識するという結論が導かれる。

実施例3

本発明の核酸の塩基配列からのプライマーを用いた

C. jejuni 由来のDNAのインピトルでの酵素増幅

プライマーの選択

PCRの特異性を決定するのは基本的にオリゴヌクレオチドプライマーの3'末端であることは分かっている (W. Innis et al., PCR Protocols, Academic Press Inc.)。従って、このの3'領域が増幅すべき目標物に対して完全に特異的であることが重要である。

カンピロバクターのゲノムのグアニンおよびシトシンの比率は非常に小さいので (G+Cで28~30%)、3'末端がG+Cを

カンピロバクター属に属さないバクテリアからのDNA

上記バクテリアと陽性コントロールとして用いたC. jejuniとのDNAを酵素Bgl IIで加水分解し、得られた断片をアガロースゲル電気泳動で分離し、ナイロン膜 Hybond-N へと移した。各DNA断片をベーリングー社の「Random primed DNA Labelling」キットの指示に従って、³²Pでラベル化された VS1断片をプローブとして用いた分子ハイブリダイゼーションで分析した。オートラジオグラフィーで検出された唯一の種は C. jejuni であった。カンピロバクター種以外のDNAでは72時間暴露後でもハイブリダイゼーションは全く検出されなかった。

C. jejuni 以外のカンピロバクター原由来のバクテリアのDNA

カンピロバクター種を適当な培地 (5%の羊血清アガー、バイオメリュー (Biomerieux) 社) で培養した後、以下の方法で処理する。

各ペトリ皿からバクテリアを2mLのTE-グルコースバッファー (25mMのpH 8トリス塩酸、10mMのEDTA、50mMのグルコース) を用いて回収し、5,000gで5分間遠心分離する。ケーキを再度懸濁し、TE-グルコールで洗浄し、再度遠心分離する。バクテリアを100μLのTEバッファー (10mMのpH 8のトリス塩酸、1mMのEDTA) に再懸濁し、ピッチャーラー遠の方法でDNAを抽出する (Pitcher et al., Lett. Appl. Microbiol., 1989, 8, 151-156)。抽出したDNAを酵素Bgl IIを用いて完全に切断する。得られた断片を0.8%のTAEアガロースゲル上で電気泳動して分離した後、サンサン法に従ってナイロン膜上に移す。

移した断片を分子ハイブリダイゼーションで分析する。この

多く含むプライマーは高い特異性を示すと考えられた。

本発明者らは、VS1配列中にG+Cを多く含みものを探した結果、VS1中に一度だけ存在した。この領域からプライマーの配列を決め、長さが約20ヌクレオチドとなるように終了させた。

オリゴヌクレオチドプライマーの合成

VS1配列に由来するOligo VS15 および Oligo VS16 と名付けた上記の配列を有する長さがそれぞれ21および22ヌクレオチドのプライマーをホスホラミダイト(phosphoramidites)を基礎にしたミリポア(Millipore)社の自動装置「サイクロンプラス(Cyclone Plus)」で合成した。合成後、オリゴヌクレオチド溶液を試験管に移し、濃縮した水酸化アンモニウム中で55℃で16時間培養した。オリゴヌクレオチドをエタノールで沈殿させた後、ケーキを70%のエタノールで洗浄し、乾燥し、最後に1mLの滅菌蒸留水に懸濁した。各プライマーの濃度は分光光度計で測定した。

増幅

増幅法として、例えばサイキ達の手順に従ったインビトロ酵素増幅法(PCR)を用いた(Saiki et al., Science, 1988, 239, 487-491)。この方法では、1μMのオリゴヌクレオチドOligo VS15 および Oligo VS16 と、異なるカンピロバクター株に由来するDNA 30-100ngと、0.5ユニットのTaqポリメラーゼと共に用いて、バッファー(25mMのKCl、pH8.5のトリス塩酸20mM、塩化マグネシウム1.5mM、デオキシリボヌクレオチドトリホスフェート200 μM および牛血清アルブミン100 μM/組を含む)中で最終的な反応容量を50μLにして行う。

PCR法の各段階でのパラメータは以下のように選択した: 94℃で5分、60℃で1分、72℃で1分、次いで(94℃で1分、

さらに、ホロホロショウから単離した15のC. jejuni株で上記PCR法でC. jejuniの同定テストをした。株を継代培養した後にDNAを抽出し、増幅した。株は全てC. jejuniと同定され、これは予め行った生化学試験と一致した。

PCRテストの感度の決定

上記オリゴヌクレオチドペアを用いてPCR法でC. jejuniのDNAの検出時の絶対的閾値を求めるために、C. jejuniバクテリア懸濁液の10倍に希釈したPCRによる増幅を行った。増幅は40サイクルを行い、各サイクルは上記条件と同じにし、希釈液を適当な溶菌バッファーと混合した後、熱処理(65℃で15分間、統いて95℃で10分間培養)した。溶菌バッファーの組成は以下の通り: トリス塩酸10mM、EDTA 1mM、pH8の0.5%Tween 20、0.5%Nonidet-P40 および 500μg/mLのプロテイナーゼK。

溶菌で使ったものと同じ各希釈液の100μL量をカンピロバクター用培地を入れたベトリ皿に広げ、48時間培養後にコロニーを数えた。これらの条件下での検出限界は7バクテリアであった。

各希釈液10μLを地幅するPCR法での検出限界は統計的には1バクテリアである(理論上の希釈は、 3.5×10^7 バクテリア/100 μL ~ 3.5バクテリア/100 μLで、それぞれ100 μL当たりのベトリ皿のバクテリアカウントは 2.5×10^7 、 10^8 、 10^9 、 1.5×10^4 、560、32、7および0に対応する)。

結論として、このプライマーペアによってC. jejuni種を特異的に検出できることは重要であり、それによってC. jejuniに感染した患者や生物試料から単離したものを同定することができ、臨床細菌学および獣医学の分野で使用できる。

本発明によるC. jejuniの検出方法は上記のオリゴヌクレオ

60℃で1分、72℃で1分)を28回、そして最終サイクルを94℃で1分、60℃で1分、72℃で5分。自動装置を用いてこれを30サイクルを行う。最終サイクル後、分析まで試料を4℃に維持する。

増幅させた試料のアガロースゲル上での電気泳動分析

増幅させた試料10μLを、1μg/mLのエチジウム臭素を含むTBEバッファー(0.04Mのトリス塩酸、0.001MのEDTA)中で2%アガロースゲル上に添加する。増幅させた断片をUV下で視覚化し、ポラロイド(Polaroid 667)フィルムを用いてゲルを撮影する。

カンピロバクター由来の各種DNAと、カンピロバクター属に属さないバクテリア由来の各種DNAと、プライマー Oligo VS15および Oligo VS16とを用いて得られた結果を比較した。このプライマーペアを用いて増幅させた断片に期待される理論上の長さは358 基対である。

そのような断片はC. jejuniから抽出されたDNAのみで得られる。

以下の株: C. coli、C. lari、C. fetus subsp. fetus、C. fetus subsp. venerealis、C. hyoilectinalis、A. cryaerophilus、C. sputorum subsp. sputorum、C. sputorum subsp. bubulus、C. concisus、C. facalis、B. coli、H. pylori、S. typhimurium、C. curvusおよび人の細胞から抽出したDNAを分析したものでは、上記の期待されるサイズの断片の増幅は見られない。

C. fetus subsp. fetusの場合、分子量の大きい断片が増幅されたが非特異的であった。すなわち、ナイロン膜に移した後のこの断片は³²Pでラベル化したVS1プローブとハイブリダイズしない。

テドプローブを用いて食品(チキンスカロッピーニ、牛肉、牛乳、水)中のC. jejuniの存在を調べるために使用することもできる。この場合にはバクテリアの溶菌前に低速遠心分離によって粗食料粗縫を除去する必要がある。そうすることによってPCRテストの結果を向上させ、増幅反応の阻害に起因して誤って陰性と判断する危険を避けることができる。

配列リスト

I 一般情報

(1) 出願人 : バスツール研究所
 (2) 発明の名称 :
 カンピロバクタージュジュニ(Campylobacter jejuni)
 のゲノムの塩基配列と特異的にハイブリダイズ
 するスクレオチド配列
 (3) 配列の数 : 4

II 配列No.1に関する情報:

配列特性:

タイプ : スクレオチド
 長さ : 147 塩基対
 鎖の数 : 一本鎖
 形状 : 直線
 分子タイプ : DNA
 生物体 : Campylobacter jejuni
 名称 : VS1

配列:

10 20 30 40 50
 AACCTTGAGA TACTTTTAAAG TGCTATAGAA ACTGAAAAATG AAATTTCTTT
 60 70 80 90 100
 AGCAGGCATA TATAGAGCGT ATTGTTCCAA ATTTGATTTA AAAGATGAAA
 110 120 130 140 --
 TTTTAAATG GGGTCTTTAA ATATTTAAAA ACAATAATGC CTTAAAAA

III 配列No.2に関する情報:

配列特性:

タイプ : スクレオチド
 長さ : 1,189 塩基対
 鎖の数 : 一本鎖
 形状 : 直線
 分子タイプ : DNA
 生物体 : Campylobacter jejuni
 名称 : VS1

配列:

10 20 30 40 50
 AACCTTGAGA TACTTTTAAAG TGCTATAGAA ACTGAAAAATG AAATTTCTTT
 60 70 80 90 100
 AGCAGGCATA TATAGAGCGT ATTGTTCCAA ATTTGATTTA AAAGATGAAA
 110 120 130 140 --
 TTTTAAATG GGGTCTTTAA ATATTTAAAA ACAATAATGC CTTAAAAA
 150 160 170 180 190 200
 TTTTAAATG GGGTCTTTAA ATATTTAAAA ACAATAATGC CTTAAAAAAGAT
 210 220 230 240 250
 TTCTAACTCA GAAAATTAGA ARAATTAGA GCTTTATAT ACTTTAACCT
 260 270 280 290 300
 GGCTAAAGGC TAAAGGCTTA AATTATAATG CTTTTATTT TAGAGTCCTT
 310 320 330 340 350
 GATAAACCTT TAGAAAATGC AAAACRAGGT TTTGAAGATG AAAATCTACT
 360 370 380 390 400
 TGAAGAAAGT GCAAGAAGGG TAAAAAAAGA ATTAAACACTT AAAAGAAGTA
 410 420 430 440 450
 AGATTTTTTT AGAGCAACAT GAAAATTAGC AGGATAAAT CATAACATATC

460 470 480 490 500
 AAATCAAAATC TTTTTATTAT AAAAAATACT TTTGAAGATA TTGTTATGAT
 510 520 530 540 550
 TTCTAACTTA GCAAAGAAA ATGATTTAA ATTTTGGTTT AGTAATGAAA

1110 1120 1130 1140 1150
 AAGAATTAGA ATATCGTGGC TATGATAGTG CGGGTATGCC AGTGATGCCA
 1160 1170 1180
 GAAGGCGAAC TTAGTTTTT TAAAGCTGTA GGAAAGCTT

560 570 580 590 600
 CAAATCTTAG TTTCGAATT TTTCACACAC TTCAATTAA TATTGCCATT
 610 620 630 640 650
 ATTTTAAGTT CTTAACAAA TTAAATCTT ATTTTATCA ATTTTTTGA
 660 670 680 690 700
 ACTTTTTGAT GATAAAATT ATTTAAGGTT TGAATATGAT AATATTATCA
 710 720 730 740 750
 CTGATGAGCA AAAACTAAAA CTTTTGAGC TTTTAATTC AAACTTTCT
 760 770 780 790 800
 GGTTTTAATT TGAAAAAAAT TAAAAAGCCA ATCATTAAAA AAAGAGGAGT
 810 820 830 840 850
 AAAATTAGAC TAAACTTAA CTAAATGTA TCCCAATTAA GGTCTTAAATA
 860 870 880 890 900
 CTAAAGATCA GCAAGTTTA ATGGCTTAAT TGATGAATGT TTTTAATGAA
 910 920 930 940 950
 CTTGAACCTG TTTTATGTC AGCAAAATT CAACCATTA GACAAGGAC
 960 970 980 990 1000
 GCGTAAATATC TTATTTTTC AAAAGAATGA AAAATTAAGAA CATAGCGAC
 1010 1020 1030 1040 1050
 AAAACTTGT TAAATTTATA ATAAGTGTGAT AAAAATGCT GTGGAATGCT
 1060 1070 1080 1090 1100
 AGGCTATATA GGAAATATG AAAAAAAACA ATTTATCTA AATGGACTTA

IV 配列No. 3に関する情報:

配列特性:

タイプ : スクレオチド
 長さ : 21塩基
 鎖の数 : 一本鎖
 形状 : 直線
 分子タイプ : DNA
 生物体 : Campylobacter jejuni
 名称 : Oligo VS15

 * GAA TGA AAT TTT AGA ATG GGG *

V 配列No. 4に関する情報:

配列特性:

タイプ : スクレオチド
 長さ : 22塩基
 鎖の数 : 一本鎖
 形状 : 直線
 分子タイプ : DNA
 生物体 : Campylobacter jejuni

名称 : Oligo VS16

配列 :

5'-GAT ATG TAT GAT TTT ATC CTGC 3'

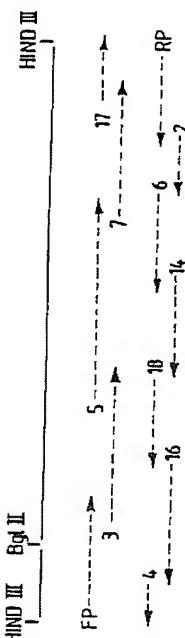


FIG.1

国際調査報告		
Int. Appl. No. PCT/FR 94/00122		
A. CLASIFICATION OF SUBSTANCE IPC 5 C12Q1/68 C07H21/00 C07H21/04 C12N15/63		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Class Schemes and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
WORLDWIDE SEARCHED (Each Searcher's Public Disclosure to Camilleau French) IPC 5 C12Q		
DOCUMENTS CONSIDERED RELEVANT AND RELEVANCE ASSESSED IN THE CLAIMS OR IN THE DESCRIPTION OR CLAIMS		
DOCUMENTS AND THEIR RELEVANCE ASSESSED IN THE DESCRIPTION AND CLAIMS BY EACH SEARCHER		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant portion	Reference to claim No.
X	J CLIN MICROBIOL 30 (10) 1992, 2613-2619. CCDEN: JCM102 ISSN: 0095-1137 6 - (C) FILE- BIOSIS CYDO B A et al "SPECIFIC DETECTION OF CAMPYLOBACTER -JEJUNI AND CAMPYLOBACTER -COLI BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION." see the whole document	1-14
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 15, no. 302 (C-0855) & JP,A,03 112 498 (SHIMADZU CORP) 14 May 1991 see abstract	1-14 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Prior art documents are based on the examination of both C. <input checked="" type="checkbox"/> Prior art documents are based on claim.		
* Special comments on this document: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" document not published on or after the international application date "C" document which has a direct bearing on the patentability of the claims as a result of either the disclosure of a new method or of new materials, but, nevertheless, not concerning a patentable invention "D" document relating to an application filed by the same inventor(s) and published after the international application date "E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
20 May 1994		15-06-1994
Name and mailing address of the DLA European Patent Office, P.O. 30111 Potsdam 3 D-1233 FR-Berlin Tel. (+ 31-95) 340-2000 Fax (+ 31-95) 340-2014		Authorized officer
Molina Galan, E		

国際調査報告		
Int. Appl. No. PCT/FR 94/00122		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant portion	Reference to claim No.
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 14, no. 15, 1986, ARLINGTON, VIRGINIA US pages 6115 - 6128 JABLONSKI ET AL. cited in the application see the whole document	1-8
A	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY vol. 27, no. 2, February 1989, WASHINGTON US pages 321 - 326 CHEVRIER ET AL. 'Identification and classification of Campylobacter strains by using nonradioactive DNA probes' cited in the application see the whole document	14
A	ZENTRALBLATT FÜR BAKTERIOLOGIE vol. 272, 1989, STUTTGART, DE pages 186 - 190 ZHUO AND WANG 'Application of a biotin labelled DNA probe to detect Campylobacter' cited in the application	
A	WO,A,85 04422 (INTEGRATED GENETICS) 31 July 1985	

国際調査報告			
D. de l'application No PCT/FR 94/00122			
Patent document cité dans la demande	Publication date	Patent family number(s)	Publication date
WO-A-8604422	31-07-86	US-A- 4785086 EP-A- 0208772	15-11-88 21-01-87

国際調査報告			
D. de l'application No PCT/FR 94/00122			
A. CLASSEMENT DU SUJET DE LA DEMANDE C1B 5 C12Q1/68 C07H21/00 C07H21/04 C12M15/63			
Sous la direction générale et sous la responsabilité de la Direction de la recherche et de la technologie et de la CDT			
B. DOMAINES ET LÉGEBRES LA RECHERCHE A POSTER			
Communication relative à une demande d'unité de classification dans des catégories de classement			
C1B 5 C12Q			
Communication relative à ce que la communication indiquée dans la demande de classification fournit des renseignements utiles à propos de la recherche			
Date de dépôt de la demande dans les domaines de recherche indiqués dans la liste de classification, et de date de l'ensemble, lorsque la recherche échoue			
C. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PARENTS			
Category	Identificateur des documents utilisés, et, si ce n'est pas le cas, l'indication des paragraphes pertinents	Date de publication	
X	J CLIN MICROBIOL 10 (10). 1992. 2613-2619. Coden: JCMW ISSN: 0095-1137 6 ~ (C) FILE BIOESIS CYTO B A et l' 'SPECIFIC DETECTION OF CAMPYLOBACTER -JEJUNI AND CAMPYLOBACTER -COLI BY USING POLYMERASE CHAIN REACTION.' voir le document en entier	1-14	
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 15, no. 302 (C-0855) & JP-A-03 112 498 (SHIMADZU CORP) 14 Mai 1991 voir abrégé	1-14	
--/--			
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la liste des autres C pour la 2e et la 3e liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de la liste de brevet sont disponibles en version	
* Catégories spéciales de documents utilisés			
* A* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* B* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* C* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* D* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* E* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* F* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* G* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* H* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* I* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* J* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* K* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* L* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* M* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* N* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* O* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* P* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* Q* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* R* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* S* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* T* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* U* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* V* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* W* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* X* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* Y* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
* Z* documents utilisés pour la recherche, mais nécessitant des modifications pour leur utilisation			
Date à laquelle le document a été déposé dans la demande			
20 Mai 1994			
Nom et adresse du dépôt de la demande déposée à l'administration régionale de la recherche internationale Office International des brevets, P.O. Box 17 P.O. Box 17 M. 3210 33Y Geneva Téléphone: (41-22) 346-3056 Fax: (41-22) 346-3056			
Fonctionnaire chargé Molina Galan, E			

国際調査報告			
D. de l'application No PCT/FR 94/00122			
Category	Identificateur des documents utilisés, et, si ce n'est pas le cas, l'indication des paragraphes pertinents	Date de publication	
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH vol. 14, no. 15, 1985, ARLINGTON, VIRGINIA, US pages 6115 - 6128 JABLONSKI ET AL. cité dans la demande voir le document en entier	1-8	
A	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY vol. 27, no. 2, Février 1989, WASHINGTON US pages 321 - 326 CHEVRIER ET AL. 'Identification and classification of Campylobacter strains by using nonradioactive DNA probes' cité dans la demande voir le document en entier	14	
A	ZENTRALBLATT FÜR BAKTERIOLOGIE vol. 272, 1989, STUTTGART, DE pages 186 - 190 ZHOU AND WANG 'Application of a biotin labelled DNA probe to detect Campylobacter' cité dans la demande	--/--	
A	WO-A-86 04422 (INTEGRATED GENETICS) 33 Juillet 1986	--/--	

Document brevet ou auquel fait référence	Date de publication	Identifiant(s) de (formulaire de brevet)	Date de publication
WO-A-8604422	31-07-86	US-A- 4785086 EP-A- 0208772	15-11-88 21-01-87